

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-081044

(43)Date of publication of application : 27.03.2001

(51)Int.Cl.

A61K 39/00

A61K 9/127

A61K 31/711

A61P 37/04

(21)Application number : 11-259717

(71)Applicant : TOKAI UNIV
NIPPON ZEON CO LTD

(22)Date of filing : 14.09.1999

(72)Inventor : MIZUOCHI TSUGIO
KOJIMA NAOYA
YASUDA KANJI**(54) LIPOSOME AND VACCINE COMPRISING THE SAME****(57)Abstract:**

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a liposome having adjuvant activities for immunity induction, having low toxicity and antigenicity of itself, and useful as a practicable DNA vaccine by allowing the liposome to have a specific oligosaccharide on the surface, and a nucleic acid.

SOLUTION: This liposome contains (A) an oligosaccharide consisting of 2-11 sugar residues and capable of bonding to the lectin derived from an antigen-presenting cell, on the surface, and (B) a nucleic acid. The contents of the components A and B are 0.5-500 µg and 0.1-500 µg respectively based on 1 mg of the lipid constituting the liposome. The lipid constituting the liposome is preferably composed of cholesterols having a positive charge in combination with the cholesterol having no charge, and when the amount of the cholesterols having the positive charge is 5-50% of the whole amount of the cholesterols, the liposome can efficiently include the DNA. The component A is preferably a mannanose, a mannotriose or the like.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2001-81044
(P2001-81044A)

(43) 公開日 平成13年 3 月27日 (2001. 3. 27)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト* (参考)
A 6 1 K 39/00		A 6 1 K 39/00	4 C 0 7 6
9/127		9/127	4 C 0 8 5
31/711		31/711	4 C 0 8 6
A 6 1 P 37/04		A 6 1 P 37/04	

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平11-259717

(22) 出願日 平成11年 9 月14日 (1999. 9. 14)

(71) 出願人 000125369

学校法人東海大学

東京都渋谷区富ヶ谷 2 丁目28番 4 号

(71) 出願人 000229117

日本ゼオン株式会社

東京都千代田区丸の内 2 丁目 6 番 1 号

(72) 発明者 水落 次男

東京都世田谷区岡本二丁目24番19号

(72) 発明者 小島 直也

神奈川県平塚市山下1072- 1

(74) 代理人 100089484

弁理士 和田 靖郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リボソームおよびそれからなるワクチン

(57) 【要約】

【課題】 タンパク質を抗原提示細胞中で多量に発現することができる遺伝子ワクチンを提供する。

【解決手段】 2 ～ 1 1 個の糖残基から成り、抗原提示細胞由来のレクチンに結合するオリゴ糖を表面に有し、かつ核酸を有するリボソームを遺伝子ワクチンの有効成分として用いる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 2～11個の糖残基から成り、抗原提示細胞由来のレクチンに結合するオリゴ糖を表面に有し、かつ核酸を有するリボソーム。

【請求項2】 請求項1に記載のリボソームを含有する遺伝子ワクチン。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】本発明は、DNAまたはRNAなどの核酸を主成分とするいわゆる遺伝子ワクチン（以下、DNAワクチンということがある）に関する。

【0002】

【従来の技術】従来より、ワクチンや免疫療法剤では、病原体の抗原タンパク質を用いたワクチンやこれにさらに免疫原性を高めるための補助剤としてアジュバントを混合した製剤（以下、コンポーネントワクチンという）、あるいは病原体を弱毒化させた生ワクチンなどが実用化されている。近年、抗原タンパク質をコードするある種の核酸を動物に接種すると、その個体中で抗原タンパク質が発現し、その個体が抗原タンパク質に対する免疫応答を起こすことが明らかになっている。こうしたことから、核酸そのものを有効成分とする、新たなワクチンの可能性が期待されている。しかしながら、核酸をそのまま動物に接種しても、核酸が発現する抗原タンパク質量は微量でありワクチン効果が得られることはほとんどない。ワクチン効果を得るためには、数100μgの多量のDNAを頻回個体に接種する必要があるが、こうした多量のDNA接種は実用化に望ましい方向ではない。そこで、接種DNA量を減らす検討が進められ、DNAを金やタングステン粒子のコロイドと混合して強力な圧縮ガスを用いて接種する方法（ジーンガン法）や電気的に細胞に穴を開けてDNAを細胞内に導入する方法（エレクトロポレーション法）が開発されているが、これらの方法はいずれも特別な設備を必要とする。その上、これらの方法で遺伝子が導入される細胞は、免疫担当細胞にかぎらないため効率が悪いので、こうした機械的手法は現実的ではない。そこで、より実用性を高めるため、種々のサイトカイン遺伝子と抗原タンパク質をコードするDNAとを同時に接種して、サイトカインと抗原タンパク質と共発現させ、これにより免疫原性を高める検討も行われている。一方、抗原タンパク質は一般に抗原提示細胞に取り込まれ、その中でタンパク質のプロセッシングを受けたのち、主要組織適合複合体（MHC）分子とともにその細胞表面に表現されて、T細胞に認識される必要があることが知られている。上述した方法では、抗原提示細胞に選択的にDNAが取り込まれないと推測され、実際、Van Tendeloo VFらは抗原提示細胞である dendritic 細胞にDNAが効率よく取り込まれないことを報告している（Gene Therapy, 5, 700-707 (1999)）。

DNAが大量に体内に入ると、抗DNA抗体が産生され、新たな病気を引き起こす懸念もあるため、DNAワクチンの接種DNA量はできる限り減らすことが求められている。

【0003】ところで、コンポーネントワクチン用のアジュバントとしては、例えば、結核菌の死菌菌体と鉱物油を混合してなるフロインド・コンプリート・アジュバントや鉱物油からなるフロインド・インコンプリート・アジュバントなどの鉱物油を用いるアジュバント、燐酸化アルミニウムアジュバントあるいは水酸化アルミニウムを主成分とするアラムアジュバントのような無機アジュバントなどが知られている。アジュバントは接種する動物に対してより毒性の低いものであることが望まれ、新たに毒性のないコンポーネントワクチン用のアジュバントとしてある種のリボソームが開発された（特許第2828391号公報）。リボソームをDNAワクチン用のアジュバントとして使用する例は、Vaccine 14, 747 (1996) などにおいて検討されているが、リボソームのDNA含有量が少なく、必然的に細胞へ移入できるDNA量も限られてしまい、未だ実用化レベルには到達していなかった。また、免疫増強作用を高めることができるかどうかまでは確認されていなかった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】DNAワクチンとして、効率よく細胞へDNAを導入するために、金コロイド粒子を担体として用いることが提案されている（特開平11-92406号公報）。しかしながら、本発明者らの検討の結果、十分な再現性が得られず、ワクチンとしての実用性にかけていることが判った。

【0005】かかる従来技術のもと、タンパク質を抗原提示細胞中で多量に発現することができる遺伝子ワクチンを得るべく鋭意検討した結果、コンポーネントワクチン用のアジュバントとして知られているリボソームを遺伝子ワクチンに適用すると、効率的に免疫誘導が得られることがわかり、本発明を完成するに至った。

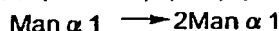
【0006】

【課題を解決するための手段】かくして本発明によれば、2～11個の糖残基から成り抗原提示細胞由来のレクチンに結合するオリゴ糖を表面に有し、かつ核酸を有するリボソームが提供され、また当該リボソームを含有する遺伝子ワクチンが提供される。

【0007】

【発明の実施の態様】本発明のリボソーム（以下、核酸含有リボソームということがある）は、特許第2828391号公報記載のリボソームにDNAまたはRNAなどの核酸を含むものである。以下に当該公報記載のリボソームを簡単に説明する。当該リボソームはその表面に、抗原提示細胞由来のレクチンを結合することができ、且つ2～11個の糖残基から成るオリゴ糖を有して

いる。ここで、抗原提示細胞は、マクロファージ、 dendritic 細胞等を意味する。また、抗原提示細胞由来のレクチンとは、上記のごとき抗原提示細胞の表面に存在するマンノース・レセプター等を意味する。オリゴ糖は、D-マンノース (D-Man)、L-フコース (L-Fuc)、D-アセチルグルコサミン (D-GlcNAc)、D-グルコース (D-Glc)、D-ガラクトース (D-Gal)、D-アセチルガラクトサミン (D-GalNAc)、D-ラムノース (D-Rha) などの単糖が $\alpha 1 \rightarrow 2$ 結合、 $\alpha 1 \rightarrow 3$ 結合、 $\alpha 1 \rightarrow 4$ 結合、 $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合または $\beta 1 \rightarrow 4$ 結合等あるいはこれらの組合せにより 2~11 個結合したものである。特に好ましいオリゴ糖として、マンノビオース (Man 2)、マンノトリオース (Man 3)、マンノテトラオース (Man 4)、マンノペンタオース (Man 5)、マンノヘキサオース (Man 6)、マンノヘプタオース (M



【0010】(式中、 $\alpha 1 \rightarrow 2$ 結合している Man は、それぞれ独立に存在していてもよく、存在していなくてもよい。)

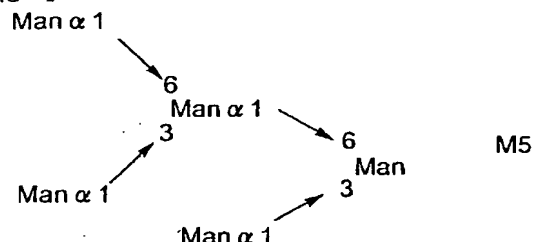
【0011】上記のオリゴ糖は、いずれも 1 個の還元末端アルデヒド基を有する。そこで、このアルデヒド基を、オリゴ糖をリポソーム表面に導入するため、アミノ基を有するリン脂質と反応させて Schiff 塩基を形成し、次にこの Schiff 塩基を、常法に従って、還元、好ましくは化学還元、例えば NaBH_3CN により還元することにより、オリゴ糖と、脂質とを結合することができる(水落次男、糖質工学、224-232 頁、産業調査会バイオテクノロジー情報センター、1992)。このようにして得られた、オリゴ糖と脂質との結合物を、本発明においては人工糖脂質と称する場合がある。

【0012】リポソームを構成する脂質は、リポソームを構成するために知られている通常の脂質を単独でまたは複数組合わせて使用することができる。そのような脂質としては、例えば、卵黄、大豆、またはその他の動植物などの天然物由来の脂質やこれらを水素添加によって不飽和度を低下したもの、あるいは化学合成したものが挙げられる。より具体的には、コレステロール (Chol)、 3β -[N-(ジメチルアミノエタン)カルバモイル]コレステロール (DC-Chol)、N-(トリメチルアンモニオエチル)カルバモイルコレステロール (TC-Chol) などのステロール類；ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (DPPE)、ジス

an 7)、種々の混合オリゴ糖や、下式の M5 および RN など特許第 2828391 号公報記載のものが挙げられる。

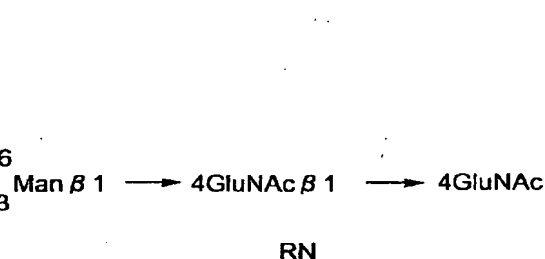
【0008】

【化1】



【0009】

【化2】



テアロイルホスファチジルエタノールアミン (DSP E) などのホスファチジルエタノールアミン類；ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC) などのホスファチジルコリン類；ジパルミトイルホスファチジルセリン (DPPS)、ジステアロイルホスファチジルセリン (DSPS)；ホスファチジン酸類、例えばジパルミトイルホスファチジン酸 (DPPA)、ジステアロイルホスファチジン酸 (DSPA) などのホスファチジルセリン類等が挙げられる。これらの中でも、 3β -[N-(ジメチルアミノエタン)カルバモイル]コレステロール (DC-Chol)、N-(トリメチルアンモニオエチル)カルバモイルコレステロール (TC-Chol) のような陽性荷電を有するステロール類は、DNA や RNA などの核酸との親和性が高いため特に好ましい。

【0013】陽性荷電を有するコレステロール類と荷電のないコレステロールとを併用するのが好ましく、陽性荷電を有するコレステロール類が、全コレステロール量の 5~50%、好ましくは 10~30% である場合、リポソームが効率よく DNA を有することができ、陽性荷電を有するコレステロールの割合が多すぎるとリポソームに毒性が出る場合がある。尚、ここで例示した化合物名の後ろの () 内のアルファベットは、各化合物の略号であり、以下これらの略号を使用する。

【0014】リポソームは、公知の方法、例えば D. W. Deamer, P. S. Uster, "Lipo

some" ed. by M. J. Ostro, Marcel Dekker Inc., N. Y. Basel, 1983, p 27～記載の方法（ボルテックス法および超音波法）、エタノール注入法、エーテル法、逆相蒸発法などが適用でき、これらを組合せることにより作製される。

【0015】オリゴ糖をリポソームの表面に導入するためには、例えば、次の2つの方法のいずれかを用いればよい。前記の人工糖脂質が水溶性で有機溶剤に十分溶解しない場合、例えば、前記のRNとDPPEとの結合物（RN-DPPE）を用いる場合には、これらの水性溶液を調製し、これを形成されたリポソームと混合して、例えば4℃ないし室温において0.5～120時間、例えば約24時間インキュベーションすればよい。

【0016】他方、人工糖脂質が有機溶剤に溶解する場合には、当該人工糖脂質を、リポソーム構成用脂質と共に、リポソーム製造過程において前記のごとき有機溶剤に溶解し、以後、常法に従ってリポソームを形成すればよい。リポソームの量に対するオリゴ糖の量はオリゴ糖の種類、封入しようとする核酸の種類、リポソームの組合せ構造等により異なるが、一般に、リポソームを構成する脂質1mgに対して0.5μg～500μgである。尚、オリゴ糖がリポソーム表面に結合していることは、糖に該当するレクチンを添加してリポソームの凝集反応で調べることができる。

【0017】本発明のリポソームは、多重層タイプ（multilamella vesicle）であってもよく、また単層タイプ（unilamella vesicle）であってもよい。これらは既知の常法に従って作製することができ、また常法に従って一方のタイプを他方のタイプに、例えば多重層タイプのリポソームを単層タイプのリポソームに転換することもできる。本発明のリポソームの粒径は特に限定されないが、必要により常法に従って、例えば所望の孔サイズのフィルターにより濾過することにより、粒径を整えることができる。

【0018】本発明のDNA含有リポソームを得るためには、上述してきたリポソームに、発現させたいタンパク質をコードする任意の核酸、すなわちDNAまたはRNAなどの遺伝子を封入あるいは表面結合させる必要がある。DNAやRNAは断片でもよいし、プラスミドDNAのような環状構造であってもよい。例えばDNAを用いる場合は、プロモーター配列・遺伝子配列・終了配列（転写終了、ポリA付加シグナルを含む）が存在することが望ましい。RNAの場合は細胞内で安定に存在するためのキャップ構造、ポリA配列、翻訳開始コドンより始まり、タンパク質部分をコードするRNAを含んだRNA分子であることが望ましい。このような遺伝子として、例えば病原体の抗原遺伝子、例えばヒト免疫不全症ウイルス（HIV）のgag、pol、env遺伝子、インフルエンザウイルスのHA、M遺伝子、ニュー

カッスル病ウイルスのHN、F遺伝子、マラリア原虫・結核菌などの外被タンパク質遺伝子等の全部あるいはその一部の遺伝子を含む核酸が挙げられる。また、宿主由来の遺伝子、例えばサイトカインの遺伝子のような機能性タンパク質をコードする遺伝子が挙げられる。

【0019】これらのDNAやRNAの調製方法としては、従来からの方法、例えば、ウイルス感染細胞からウイルスDNAやRNAを調製する方法などが挙げられる。宿主由来の遺伝子であれば、宿主動物の染色体DNAから直接にあるいは目的とする遺伝子の相補的DNAから調製することができる。プラスミドDNAの場合は、形質転換された大腸菌等の細菌より大量に調製することができる。

【0020】リポソームの量に対する核酸の量は、非常に重要であり、核酸の種類、リポソームの組成や構造等により異なるが、一般にリポソームを構成する脂質1mg当り0.1μg～500μgである。リポソームが核酸を有していることは核酸の紫外部吸収あるいは核酸と特異的に結合する試薬、例えばエチジウムブロマイド、あるいは標識された核酸、例えばメチルグリーン標識のDNAを用いて調べることができる。

【0021】本発明の遺伝子ワクチンは、上述した、核酸が結合したリポソームでさらに人工糖脂質を含有するものであり、培養細胞に遺伝子を導入したり、ヒト・動物に注射・飲水などにより投与することにより個体の細胞内で遺伝子を発現させることができる。培養細胞に遺伝子を導入するためには、本発明の遺伝子ワクチンを細胞培養用の培地など適当な液体にけん濁した形で培養細胞に混合すればよい。また、動物への投与は生理食塩水などのバッファーにけん濁し、それを皮下、皮内、筋肉などに注射する、あるいは飲水・食物に混合して経口投与する方法をとればよい。そのような方法で個体に取り込まれた遺伝子は抗原提示細胞に効率よく取り込まれ、それらの細胞内で遺伝子が発現し、その結果、液性・細胞性免疫を誘導することができ、ワクチンとして利用されることとなる。

【0022】

【実施例】以下に実施例および実験例を挙げて本発明を説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

【0023】（参考例1）人工糖脂質の調製

α1→3結合したマンノピオース（Man2）、Manα1→6（Manα1→3）Manという構造を有するマンノトリオース（Man3）、M5（化1に示した化合物）、およびRN（化2に示した化合物）2.5mgに600μlの蒸留水を加えて攪拌溶解してオリゴ糖溶液を調製した。

【0024】次に、クロロホルム／メタノール（1：1、体積比）混合液にDPPEを5mg/mlの濃度で溶解してDPPE溶液を調製した。また、メタノールに、NaBH₃CNを10mg/mlの濃度に溶解してN

aBH₃CN溶液を調製した。前記オリゴ糖の各溶液600 μ lに前記DPPE溶液9.4mlおよび前記NaBH₃CN溶液1mlを加えて攪拌混合した。この反応混合液を60℃にて16時間インキュベートし、人工糖脂質を生成せしめた。この反応混合液をシリカゲルカラムおよびC18逆相カラムにより精製することにより人工糖脂質(Man2-DPPE、Man3-DPPE、M5-DPPEおよびRN-DPPE)を得た。

【0025】(参考例2)人工糖脂質含有リボソームの作製

2 μ molのDPPCを含むクロロホルム・メタノール(2:1、体積比、以下C/Mという)溶液と、1 μ molのChol、DC-CholまたはTC-CholのC/M溶液とを、それぞれ2:1の割合で混合し合計3mlとした。これらを、それぞれ25mlの梨型フラスコに取り、エバポレーターに梨型フラスコを接続させ、40℃で減圧下、C/Mを蒸発除去し、混合脂質膜Chol/DPPC、DC-Chol/DPPCおよびTC-Chol/DPPCを作製した。同様に、1 μ molのCholまたはDC-Chol、TC-Chol溶液およびDPPC 2 μ molとM5-DPPE 0.2 μ molを用いて混合脂質膜Chol/DPPC/M5-DPPE、DC-Chol/DPPC/M5-DPPEおよびTC-Chol/DPPC/M5-DPPEを作製した。

【0026】フラスコの底に薄い脂質膜ができるが、これにクロロホルムを加えて膜を一旦溶かした後に、再度溶媒を蒸発除去した。この操作をさらに2~3回繰り返すと、きれいな脂質の薄膜ができた。デシケーターにフラスコを1時間以上入れて完全に溶媒を除き、リン酸塩バッファー(pH6.5、以下PBSという)1mlを加え、ボルテックス法でリボソームを作製後、超音波をかけて粒径を小さくした。

【0027】(実施例1)DNA含有リボソームの調製と確認

(1)DNA含有リボソームの調製

結合用DNAとしてメチルグリーン標識DNA(シグマ社製)を用いた。参考例で得たリボソームのPBS溶液1mlのうち、50 μ lに対して、メチルグリーン標識DNA 50 μ lを加えて30分間室温で放置後、20℃ 9,000 \times gで30分間遠心すると、DC-CholおよびTC-Cholを用いた場合は、メチルグリーンの色素が沈殿したリボソームに付着していたために、DNA-リボソーム複合体(DNA含有リボソーム)の形成が確認された。

【0028】(2)DNA含有リボソームの構成成分の

確認

上述の沈殿と、リボソーム 50 μ lをそれぞれC/M 200 μ lに溶解した後、遠心してDNAを沈殿除去後、真空乾燥した。次いで、それぞれをクロロホルム/メタノール/水(10/10/3;体積比)溶液40 μ lに溶解させそのうちの20 μ lをTLCプレートにスポットし、クロロホルム/メタノール/水(45/45/10;体積比)で展開した後オルシノール硫酸法でM5-DPPEがDNA含有リボソーム形成後も存在しているかを調べた。TLCによる展開法では、人工糖脂質や各脂質はそれぞれ違うR_T値を持っているため、リボソームをTLC展開することで、各リボソームごとに目的の人工糖脂質や脂質が含まれていることが確認できる。ここでのTLC展開の結果、いずれのリボソームも、目的の人工糖脂質や脂質が、DNA複合体を形成した後も存在していることが確認された。

【0029】(3)DNA含有リボソーム表面に人工糖脂質が含まれていることの証明

実施例3で作製したDNA含有リボソーム溶液の一部を採り、そのまま、あるいはM5と反応するコンカナバリンA溶液を加えてから96穴の凝集用プレートに入れ、室温放置後、凝集反応の有無を調べた。その結果、M5-DPPEを加えて作製したDNA-リボソームでのみコンカナバリンAとの凝集反応が観察され、リボソーム表面に人工糖脂質であるM5-DPPEの糖鎖が露出していることが確認された。

【0030】(実施例2)DNA含有量の確認

DC-CholとCholの組成物のDC-CholのDC-CholとCholとの合計量(1 μ mol)に対する比率が表1記載の値となるように、DC-CholとCholの比を変えて、それぞれ調製した。これとは別にDPPC 2 μ molとM5-DPPE 0.2 μ molの比にて混合した組成物を調製した。両組成物を混合し、脂質フィルムを作り、リボソームを作製した。各組成のリボソームを全量1.2mlとしその100 μ lと1mg/mlのpCMV- β Galプラスミド(ファルマシア社製)100 μ lを混合して10,000rpm、4℃、30分間遠心し、上清(200 μ l)と沈殿に分けた。沈殿中にDNA含有リボソームが形成されている。この沈殿のDNA量を測定するため、沈殿を1%SDSを含むPBS 400 μ lに溶解し、3分間煮沸後、9,000 \times g、4℃、30分間遠心し上清400 μ lを回収した。DNA量の定量は260nmの吸光度を測定して計算した。

【0031】

【表1】

表-1

DC-Chol含量 (%)	DNA含量 ($\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ リボソーム)
0	0.09
3.13	0.11
6.25	0.37
12.5	1.01
25.0	6.27
50.0	10.7
100	15.22

【0032】この結果よりリボソームがDNAを含んでいることが判り、特にDC-Chol含量が12.5%以上ではリボソーム中に極めて効率よくDNAが取り込まれていることがわかる。

【0033】(実施例3) DNA含有リボソームの抗原提示細胞内へのDNA移入・発現効果の測定

参考例2で作製したリボソームChol/DPPC、DC-Chol/DPPC、TC-Chol/DPPC、DC-Chol/DPPC/M5-DPPE、およびTC-Chol/DPPC/M5-DPPEからそれぞれ10 μl 採り、pCMV- β Galプラスミド4 μg を混合して複合体を作った。同様にリボソーム5 μl に前記プラスミド2 μg 、あるいはリボソーム3 μl に前記プラスミド1 μg を混合して複合体を作製した。

【0034】Balb/C雌マウスの腹腔細胞約4 \times 10⁵をシャーレにまき、1時間後シャーレ中の浮遊細胞を捨ててシャーレに接着した細胞をマクロファージとして使用した。このマクロファージ細胞と上記のpCMV- β Galプラスミド結合リボソームを混合し、37℃、5%CO₂存在下5時間培養した後培地を交換しさらに48時間培養した。ついで、2%パラホルムアルデヒド500 μl を加えて10分間室温で放置して固定した後、2mg/mlのXgalを加えて遮光して反応させ、染色細胞をカウントしDNA移入・発現細胞とした。

【0035】

【表2】

表-2

DNA量	A(注)	B(注)	A/B
1 μg	454個	92個	4.9
2 μg	616	240	2.6
4 μg	524	169	3.1
0 μg	51	58	0.9

【0036】注) A: DC-Chol/DPPC/M5-DPPE使用時の陽性細胞数

B: DC-Chol/DPPC使用時の陽性細胞数

【0037】なお、TC-Chol/DPPC/M5-DPPEとTC-Chol/DPPCを使用した実験の場合も、上記と同様、TC-Chol/DPPC/M5-DPPEでは β -Gal発現マクロファージ細胞数の増加結果が得られたが、TC-Chol/DPPCを使

用した場合には、 β -Gal発現マクロファージ細胞数の増加が認められなかった。また、M5-DPPEのかわりに、参考例1で得られた人工糖脂質Man2-DPPE、Man3-DPPEあるいはRN-DPPEを用いても上記と同様の結果が得られた。

【0038】同時にマウス3T3細胞(上皮系細胞)を使用し、同じ実験を行った。その結果、リボソームとしてDC-Chol/DPPC/M5-DPPEとDC-Chol/DPPCを使用した場合の陽性細胞数に顕著な差は認められず、陽性細胞数は100個程度と上表のBカラムと同程度の細胞数であった。したがって、本発明によるリボソームは抗原提示細胞において通常の上皮系細胞以上に効率よくDNAを細胞内に移入・発現できることが明らかとなった。抗原提示細胞以外の細胞にDNAが移入されても、目的とする免疫誘導は得られない。抗原提示細胞内で抗原タンパク質が発現すると免疫誘導は起こる。従って、本発明のリボソームをDNAワクチンとして用いると、選択的に抗原提示細胞にDNAが移入されるため、DNAワクチンの接種量を少量に抑えても十分な効果の得られることが判る。

【0039】(実施例4) DNA-リボソームのマウス免疫試験

(1) ニューカッスル病ウイルス(NDV)のF遺伝子を持ったプラスミドpCMV-NDV-Fの作製
NDVのF抗原のcDNAがクローニングされたプラスミドpNZ98(特開平3-27284)から制限酵素BamHIの部分消化後、EcoRIで完全消化した後、DNAポリメラーゼIで処理して平滑末端としてアガロース電気泳動により、約1.7kbpのNDV-F遺伝子断片を得た。一方、pCMV-Scriptプラスミド(ストラタジーン社製)を制限酵素SacIで消化した後、DNAポリメラーゼIで処理して平滑末端とし、上記NDV-F遺伝子断片と結合してpCMV-NDV-Fを得た。

【0040】DC-Chol 0.25 μmol とChol 0.75 μmol をとり、DPPC 2 μmol 、M5-DPPE 0.2 μmol の比にて脂質フィルムを作りPBSを封入したリボソームを作製した。同様にDPPC 2 μmol とDC-Chol 0.25 μmol とChol 0.75 μmol の比でリボソームを作製した。これら2つのリボソームをそれぞれ全量

1. 2mlとしその100 μ lと1mg/mlのpCMV-NDV-Fプラスミド100 μ lを混合して9,000 \times g、4 $^{\circ}$ C、30分間遠心し、上清(200 μ l)と沈殿に分けた。沈殿中のDNA量を測定するため、沈殿を1%SDSを含むPBS400 μ lに溶解し、3分間煮沸後、9,000 \times g、4 $^{\circ}$ C、30分間遠心し上清400 μ lを回収した。260nmの吸光度を測定してDNA量を計算し、終濃度1 μ gDNA/10 μ lリボソームとした。以後、M5-DPPE含有リボソームでpCMV-NDV-Fプラスミドを含有するリボソームをDC/M5-DPPE/F-DNA、M5-DPPEを持たないリボソームでpCMV-NDV-Fプラスミドを含有するリボソームをDC/F-DNAとし、M5-DPPE含有リボソームでプラスミドを含有しないリボソームをDC/M5-DPPEとした。

【0041】(2) マウス免疫実験

4週齢のBalb/C雌マウスを一群5匹で3群に分け、1匹あたり50 μ lのDC/M5-DPPE/F-DNAリボソーム(1 μ gDNA/10 μ lリボソーム)、DC/F-DNAリボソーム(1 μ gDNA/10 μ lリボソーム)、DC/M5-DPPEリボソームを背部に1回皮下接種した。3週間後、各マウスから採血し血清をプールして各血清の抗NDV中和抗体価を測定した。NDVに対する中和抗体価測定は、Morgan等の方法(Morgan, R. W., et. al. Avian Dis., 36, 858-870, 1992)に従った。

【0042】

【表3】

表-3

接種ワクチン	中和抗体価
DC/M5-DPPE/F-DNA	128
DC/F-DNA	8
DC/M5-DPPE	<4

表-4

接種ワクチン	生存鶏数/試験鶏数	生存率(%)
DC/M5-DPPE/F-DNA	10/10	100
DC/F-DNA	2/10	20
DC/M5-DPPE	0/10	0
NDV市販ワクチン	10/10	100
非接種	0/10	0

【0047】

【表5】

表-5

接種ウイルス	中和抗体価
DC/M5-DPPE/F-DNA	128
DC/F-DNA	8
DC/M5-DPPE	<4
NDV市販ワクチン	256
非接種	<4

【0043】注 100TCID₅₀のNDV Sato株を50TCID₅₀に中和する血清希釈度。1群5匹のプール血清での評価

【0044】本発明によるM5-DPPEを含むDNA含有リボソームはマウスにおいて中和抗体の誘導を著しく増強させることが明らかとなった。

【0045】(実施例5) DNA-リボソームの鶏免疫試験

鶏免疫実験

1群10羽の試験用のSPF鶏(Line M、日本生物科学研究所)が孵化したときに、実施例4で作製されたDC/M5-DPPE/F-DNAリボソーム(1 μ gDNA/10 μ lリボソーム)、DC/F-DNAリボソーム(1 μ gDNA/10 μ lリボソーム)、DC/M5-DPPEリボソームをそれぞれ一羽あたり50 μ l背部皮下に1回接種した。コントロールに使用した市販NDV生ワクチン(北里研究所)は4日齢の雛に用法通り点眼接種した。接種4週後に強毒NDVウイルス(Sato株)を104PFUとなるように右大腿部筋肉内に攻撃した。攻撃後約2週間鶏の生死および発症の有無を観察し、生存率で効果を確かめた。NDVウイルスを攻撃する際に各鶏を採血し、取得した血清中のNDVに対する中和抗体の検出を行った。中和抗体価測定は、Morgan等の方法(Morgan, R. W., et. al. Avian Dis., 36, 858-870, 1992)に従った。また、各群のNDV攻撃試験結果は表4に、NDVに対する中和抗体価測定結果は表5に示した。

【0046】

【表4】

【0048】本発明によるDNA含有リボソームは接種した鶏に対しNDVの攻撃に対する感染防御を付与し、さらに、M5-DPPEを含むリボソームとすることで、そのワクチン効果が著しく増強されることが明らかとなった。DC/M5-DPPE/F-DNAリボソームを接種した鶏の血清の中和抗体価は128倍(10羽の血清をプールして測定)と、陰性コントロールに比べ有意に高かった。これらの結果から本発明によるM5-DPPEを含むDNA-リボソームワクチンはNDVに対

する感染防御能を接種鶏に付与していることが明らかとなった。

【0049】

【発明の効果】本発明のリボソームは免疫誘導のための

アジュバント活性を有し、且つ毒性およびそれ自体の抗原性が低いので、ヒトあるいは動物に対して、DNAワクチンのアジュバントとして使用すれば、実用的なDNAワクチンが得られる。

フロントページの続き

(72) 発明者 安田 幹司

神奈川県川崎市川崎区夜光一丁目2番1号

日本ゼオン株式会社総合開発センター内

Fターム(参考) 4C076 AA19 CC06 DD63 DD68 DD70
FF34

4C085 AA03 AA38 BA01 BB21 CC31
CC33 FF14

4C086 AA01 AA02 EA16 MA02 MA05
NA14 ZB05